

Karolina ZYNEK, Agnieszka TOMASZEWSKA, Jolanta BRYJAK

e-mail: karolina.zynek@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Stabilność operacyjna tyrozynazy w reaktorze okresowym w obecności substratów oraz rozpuszczalników organicznych

Wstęp

Tyrozynaza, inaczej oksydaza polifenolowa, charakteryzuje się zdolnością konwersji dwóch typów substratów: krezolazowych (monofenole) oraz katecholazowych (difenole). Enzym ten ma szereg potencjalnych zastosowań przemysłowych: otrzymywanie polimerów, produkcja związków o znaczeniu farmakologicznym (L-DOPA), przeciwutlenia-czy czy detekcja pochodnych fenolowych [1]. W związku z powszechnie obserwowaną inaktywacją tyrozynazy w obecności substratów, szczególnie difenolowych [2], efektywne wykorzystanie właściwości tego enzymu wymaga podwyższenia jego stabilności operacyjnej przede wszystkim poprzez ograniczenie inaktywacji samobójczej. W chwili obecnej brak jest jednoznacznego wyjaśnienia mechanizmu tej reakcji, przy czym najczęściej wymienia się, jako przyczynę zjawiska, wiązanie chinonu (produktu reakcji) z białkiem oraz atak grup funkcyjnych białka wolnymi rodnikami, generowanymi podczas enzymatycznego utleniania związków fenolowych [2]. Uważa się, że zjawisko to można ograniczyć przez wprowadzenie do układu reakcyjnego rozpuszczalnika organicznego, mieszającego się z wodą, co stabilizuje wolne rodniki. Dodatkową zaletą takiego środowiska reakcji jest zwiększenie rozpuszczalności hydrofobowych substratów oraz zwiększenie rozpuszczalności tlenu, który jest ko-substratem.

Celem pracy było zbadanie stabilności tyrozynazy w obecności substratów krezolazowych (L-Tyrozyna, *o*-aminofenol) i katecholazowych (L-DOPA, *p*-*tert*-butylokatechol) oraz próba oszacowania możliwości zwiększenia stabilności enzymu w mieszaninie reakcyjnej poprzez dodanie etanolu i dimetyloformamidu w stężeniu 10%.

Materiały i metody

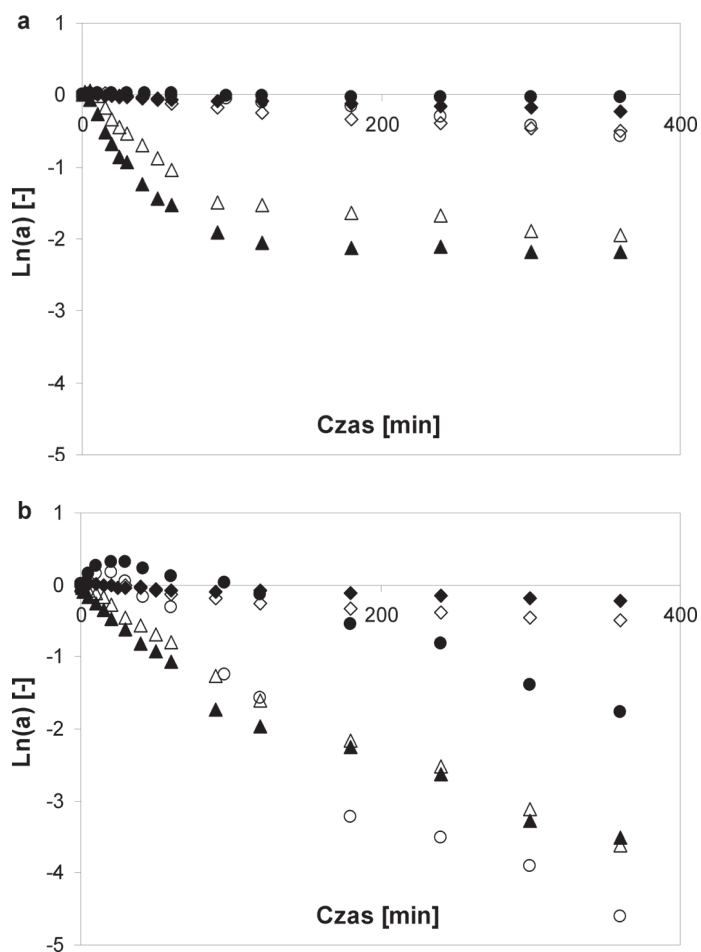
Do badań wykorzystano tyrozynazę z pieczarek (*Agaricus bisporus*) uzyskaną przy użyciu wcześniej opisanej procedury [3]. W badaniach wstępnych sprawdzono stabilność tyrozynazy w obecności różnych stężeń *o*-aminofenolu (1–10 mM) (*o*-AP), L-Tyrozyny (0,25–2 mM) (L-Tyr), L-DOPA (0,25–2 mM), *p*-*tert*-butylokatecholu (1–8 mM) (*p*-TBC) oraz dla każdego związku wybrano stężenie nie wywołujące szybkiej denaturacji enzymu. W tym celu poszczególne roztwory substratów preinkubowano w termostatowanych reaktorach okresowych w 30°C, po czym dodawano roztwór enzymu i w różnych interwałach czasowych pobierano próbki do pomiaru aktywności. Następnie zbadano wpływ dodania 10% rozpuszczalnika organicznego na reakcję prowadzoną w roztworze substratu o określonym stężeniu. Dla każdego substratu, w kombinacji z etanolem (EtOH) lub dimetyloformamidem (DMF), badano przebieg procesu inaktywacji enzymu. Aktywność tyrozynazy oznaczano spektrofotometrycznie w 30°C w obecności następujących substratów: *o*-AP (435 nm), L-Tyr (475 nm), L-DOPA (475 nm) i *p*-TBC (400 nm). Aktywność była oznaczana względem najwyższego stężenia danego substratu, a za jedną jednostkę aktywności (1U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu powoduje przyrost absorbancji o 0,001 w czasie 1 minuty.

Wyniki i ich omówienie

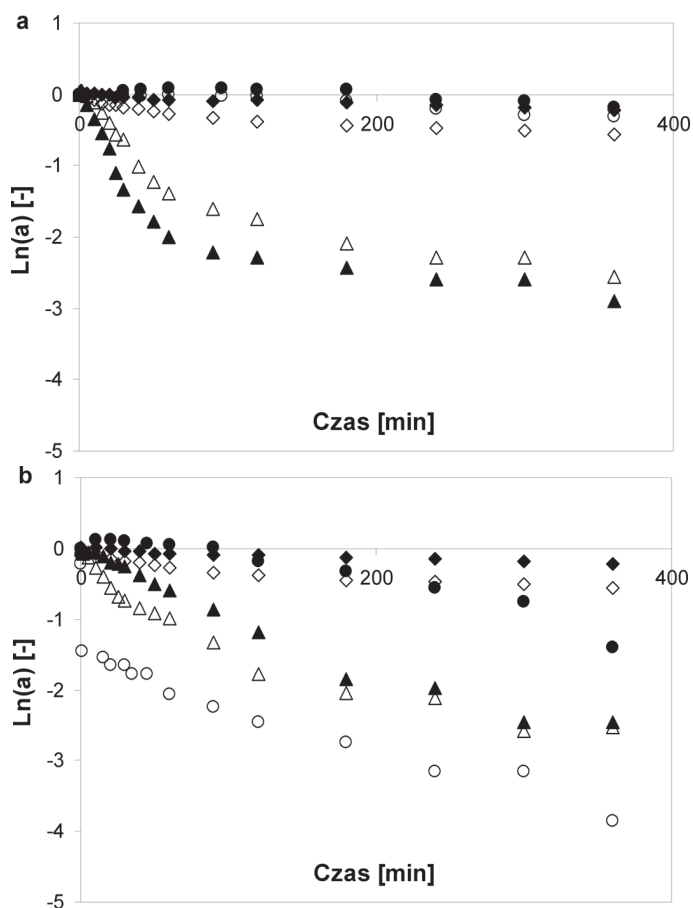
W pierwszej kolejności zbadano wpływ stężenia substratów krezolazowych (L-Tyr, *o*-AP) oraz katecholazowych (L-DOPA, *p*-TBC) na

stabilność tyrozynazy w mieszaninie reakcyjnej i dobrano takie stężenie substratu, które nie wywoływało szybkiej inaktywacji tyrozynazy. Na podstawie uzyskanych wyników (dane nie prezentowane) stwierdzono, że inaktywacja tyrozynazy w obecności substratów krezolazowych jest mniejsza od katecholazowych oraz, że dla wszystkich testowanych związków zjawisko to ma charakter umiarkowany dla stężenia 2 mM, które zostało wybrane do dalszych badań.

Zasadniczym celem pracy było zbadanie wpływu dodania etanolu lub dimetyloformamidu w stężeniach 10% (stężenia dobrano w niezależnych eksperymentach) na szybkość inaktywacji tyrozynazy w obecności testowanych substratów. W tym celu, dla każdego substratu inaktywację tyrozynazy prowadzono według schematu: kontrola dla enzymu w buforze (1), z dodaniem rozpuszczalnika (2), w obecności substratu (3) oraz układ zawierający enzym, substrat i rozpuszczalnik (4), dzięki czemu możliwe było jednoznaczne oszacowanie czynnika wywołującego dominującą inaktywację enzymu oraz możliwość ograniczenia tego zjawiska poprzez wprowadzenie ko-rozpuszczalnika do mieszaniny reakcyjnej.



Rys. 1. Inaktywacja tyrozynazy w roztworze 10% EtOH (◊) oraz w obecności substratów: (a) krezolazowych – *o*-AP (▲), *o*-AP + 10% EtOH (△), L-Tyr (●), L-Tyr + 10% EtOH (○) oraz (b) katecholazowych: *p*-TBC (▲), *p*-TBC + 10% EtOH (△), L-DOPA (●), L-DOPA + 10% EtOH (○) w porównaniu z procesem prowadzonym w buforze (◆)



Rys. 2. Inaktywacja tyrozynazy w roztworze 10% DMF (\diamond) oraz w obecności substratów: (a) krezolazowych – o-AP (\blacktriangle), o-AP + 10% DMF (\triangle), L-Tyr (\bullet), L-Tyr + 10% DMF (\circ) oraz (b) katecholazowych: p-TBC (\blacktriangle), p-TBC + 10% DMF (\triangle), L-DOPA (\bullet), L-DOPA + 10% DMF (\circ) w porównaniu z procesem prowadzonym w buforze (\blacklozenge)

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania, z których wynikało, że zarówno etanol (Rys. 1) jak i dimetyloformamid (Rys. 2) w stężeniu 10% jedynie nieznacznie obniżają stabilność tyrozynazy.

Natomiast inaktywacja enzymu w obecności prawie wszystkich testowanych substratów przebiega znacznie szybciej. Wyjątkiem jest L-Tyrozyna, w obecności której nie zaobserwowano zmian stabilności enzymu w odniesieniu do próby kontrolnej. Główną przyczyną masywnej inaktywacji tyrozynazy w obecności substratów (przede wszystkim katecholazowych) najprawdopodobniej jest proces inaktywacji samobójczej, który może być związany m.in. z obecnością wolnych rodników, powstających w mieszaninie reakcyjnej, podczas utleniania związków fenolowych. Teoretycznie, zjawisko to powinno zostać ograniczone przez wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej nawet niewielkich ilości rozpuszczalnika mieszającego się z wodą. Jednak efekt ten osiągnięto jedynie w kilku przypadkach i w stopniu umiarkowanym.

Połączenie *o*-aminofenolu zarówno z etanolem jak i dimetyloformamidem skutkowało widocznym, ale niewielkim, wzrostem stabilności tyrozynazy w porównaniu z procesem prowadzonym w wodnym roztworze *o*-AP. Natomiast dla enzymu inkubowanego w roztworze *p*-TBC z dodatkiem etanolu nie zaobserwowano zmian stabilności, a dodatek dimetyloformamidu zwiększał szybkość inaktywacji. W przypadku L-DOPA, niezależnie od użytego ko-rozpuszczalnika, zaobserwowano znaczny spadek stabilności enzymu w porównaniu z kontrolą z substratem. Natomiast inaktywacja tyrozynazy w obecności L-tyrozyny była nieznacznie modyfikowana przez dodatek obu rozpuszczalników.

Podsumowanie

Głównym celem pracy było zbadanie stabilności tyrozynazy w obecności substratów krezolazowych i katecholazowych oraz próba ograniczenia inaktywacji enzymu w mieszaninie reakcyjnej poprzez wprowadzenie do układu ko-rozpuszczalnika (EtOH lub DMF w stężeniu 10%).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że dominujący wpływ na zjawisko inaktywacji enzymu ma rodzaj substratu, a w szczególności obecność substratów katecholazowych (L-DOPA, *p*-TBC), których utlenianie wywołuje szybką utratę aktywności enzymu. Rezultaty te są zgodne z eksperymentami, opisanymi dla tyrozynazy w literaturze [2]. Natomiast wyniki otrzymane w obecności rozpuszczalników organicznych wydają się przeczyć ogólnie przyjętemu mechanizmowi inaktywacji samobójczej przez wolne rodniki. Wymagają one zatem bardziej szczegółowych wyjaśnień.

Rozpatrując mechanizm reakcji z udziałem tyrozynazy należy uwzględnić, że tyrozynaza występuje w trzech podstawowych formach: *deoksy*-, *oksy*- oraz *met*-, które związane są ze stopniem utlenienia dwóch atomów miedzi, występujących w centrum aktywnym tego enzymu [4]. *Deoksy*-tyrozynaza nie posiada funkcji katalitycznej, ale dzięki wyjątkowo dużemu powinowactwu do tlenu, łatwo przekształca się w *oksy*-formę, która jest jedyną formą enzymu, posiadającą zdolność przekształcania zarówno substratów krezolazowych (monofenole) jak i katecholazowych (difenole). Z kolei *met*-tyrozynaza powstaje w trakcie reakcji katalizowanej przez *oksy*-formę i odpowiada jedynie za reakcje z substratami katecholazowymi [5]. W efekcie utlenianie fenoli przebiega w dwóch cyklach, jednak żaden z dotychczas proponowanych mechanizmów nie wyjaśnia silniejszej inaktywacji enzymu difenolami.

W 2007 roku Land i inni [2] zaproponowali nową koncepcję wyjaśnienia inaktywacji samobójczej w powiązaniu z mechanizmem reakcji. Zgodnie z nią, największy wpływ na utratę aktywności tyrozynazy, w trakcie biotransformacji difenoli, ma nieprawidłowa orientacja przestrzenna katecholu w centrum aktywnym enzymu, czyli tzw. „prezentacja krezolazowa”, powodująca odłączenie atomu miedzi od koordynujących reszt histydylowych w centrum aktywnym i całkowitą utratę aktywności. Oznacza to, że inaktywacja samobójcza dotyczy tylko *oksy*- formy tyrozynazy i występuje w mniejszym nasileniu przy substratach krezolazowych.

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanej pracy częściowo potwierdzają przedstawioną koncepcję. Dodatkowo, wprowadzenie do układu reakcyjnego ko-rozpuszczalnika (EtOH lub DMF), nie powodowało wzrostu stabilności tyrozynazy w obecności substratów katecholazowych, co w dużej mierze podważa słuszność rodnikowego mechanizmu inaktywacji. Zatem jedynym uzasadnieniem stosowania rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą, jako środowiska reakcji dla tyrozynazy, jest zwiększenie rozpuszczalności hydrofobowych substratów oraz rozpuszczalności tlenu, który jest ko-substratem badanego enzymu.

LITERATURA

- [1] S. Halaoui, M. Asther, J.C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascolo: J. Appl. Microbiol. **100**, 219 (2006).
- [2] E.J. Land, C.A. Ramsden, P.A. Riley: Tohoku J. Exp. Med. **212**, 341 (2007).
- [3] K. Zynek, J. Bryjak: Inż. Ap. Chem **48**, nr 3, 125 (2009).
- [4] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin: Chem. Rev. **96**, 2563 (1996).
- [5] A.W.J. Tepper, L. Bubacco, G.W. Canters: J. Am. Chem. Soc. **127**, 567 (2005).

Badania współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (GRANT – wsparcie prac badawczych poprzez stypendia naukowe dla doktorantów).